

論文の内容の要旨

Development of nanoparticle detection system using the micro vibration-induced flow マイクロ振動誘起流れを用いたナノ粒子検出システムの開発研究

精密工学専攻 金子完治

本論文は、細胞外小胞やウイルスなどの生体由来のナノ粒子の検出を行うためのマイクロシステムの開発について述べている。これらのナノ粒子の検出は、医療診断や環境モニタリングにおいて重要で、様々な方法が開発されているが、感度、簡易性、コストの面でそれぞれ課題がある。本研究では、振動誘起流れと呼ばれるマイクロスケールの流れ制御手法をナノ粒子の検出に使う方法を研究・開発した。

振動誘起流れとは、流体をのせた基板に微小な振動を与えた時に、そこに設置したマイクロ構造物の周囲に正味の流れが発生する現象である。この現象を用いて、ピエゾアクチュエータに設置したマイクロチップ上の流体をごく局所的に攪拌し、そこに含まれる標的ナノ粒子と、それにアフィニティを持つマイクロサイズの粒子の結合を促進させて凝集体をつくり、凝集体のサイズを顕微鏡で計測することでナノ粒子の有無またはその濃度を測定するものである。この方法を用いることで、蛍光タグやその検出器など高価な試薬や装置を使わずに、検出感度の向上が実現されたため、新しい生体由来ナノ粒子の検出法としての価値が認められる。

論文は、英語で記述されている。

第1章では、様々なナノ粒子検出法を概観した後に、振動誘起流れの特徴とそれを用いることの有用性を議論し、本研究の目的を述べている。

第2章では振動誘起流れについて、粒子画像追跡法による詳細な流れ場計測を行っている。マトリックス状に配置された複数のマイクロピラーを有する基板上の流体において、ピラー間の空間に整然と配列されたマイクロスケールの微小渦が生じること、また、振動やピラー形状等の条件によって生じる渦流れの速度や流れパターンの詳細を明らかにした。

第3章では、渦で攪拌される流体中にモデルとしてのナノ粒子と検出用マイクロ粒子を導入し、提案手法の妥当性を検証して定量評価が可能であることを示している。モデル粒子には、特異的親和性を持つ生体分子相互作用のうち代表的なアビジンおよびビオチンをそれぞれ修飾したポリスチレンビーズを用いた。振動誘起流れの攪拌条件に応じて、ナノ粒子の吸着に介在されたマイクロ粒子の凝集体形成が生じること、また、凝集体形成の時間的変化からナノ粒子の濃度が定量できることを示した。

第4章では、流れ場と粒子の運動の数値シミュレーションを行い、実験結果との比較を行った。計算結果と実験結果がよい一致を示し、開発した数値計算手法が本システムの予測に使えることを示している。

第5章では、疾病診断のマーカーとしてここ10年ほど大きく注目されている細胞外小胞、エクソソームの検出に適用できることを示した。エクソソームに特異的に吸着するタンパク質で修飾した磁気ビーズを検出用のマイクロ粒子として使い、第3章で論じたモデル粒子を用いた実験と同様に、標的ナノ粒子としてのエクソソームの存在濃度に応じてマイクロビーズ凝集体のサイズが変化し、定量計測に供することが可能であることが示された。

第6章では、本論文のまとめと展望を述べている。

以上、本論文では、社会的にニーズの高いナノ粒子検出法の新規手法を提案・開発するとともに、そのメカニズムを詳細に調べて設計指針を示しており、学術的にも実用的にも重要な知見を示したものであると判断された。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の主題

Development of nanoparticle detection system using the micro vibration-induced flow

(邦題) マイクロ振動誘起流れを用いたナノ粒子検出システムの開発研究

2. 当該研究分野における位置づけ

細胞外小胞 (EV) やウイルス、細菌などの生体由来のナノ粒子 (NP) は、疾病診断等の様々なイムノアッセイにおいて重要なターゲットである。従来の NP 検出法は、標的の蛍光標識に依存することが多く、サンプルの事前処理や高価な検出装置を必要とする。各種のイムノアッセイのうち、免疫凝集法は、特定の NP に結合する捕捉微粒子 (CP) の凝集を利用するもので、標的分子を簡便・迅速に検出できるが、感度と再現性が比較的低い。さらに、凝集体形成過程は分子・粒子のブラウン運動のみに依存しており、液体の攪拌によって凝集効率を高め、検出感度を向上させる試みは行われていなかった。

マイクロ空間内での流体制御手法のひとつに、振動誘起流れ (VIF) がある。これは、マイクロ構造を持つ基板に周期的振動を加えることで、構造物の周囲の流体に正味の局所的な流れを誘起するものである。構造物のサイズや形状、配置を工夫することで、様々な流れ場を形成し、かつ時間的に制御できる。

本論文では、免疫凝集法による NP 検出の高感度化を目指し、VIF を適用したシステムの開発とそのキャラクターゼーションを行った。また、システム設計の指針として、VIF の数値計算手法を構築した。最後に、開発システムの生体サンプルへの応用として、EV の検出を行った。

3. 論文の構成

論文は、以下の 6 章で構成されている。

Chap 1. Introduction

Chap 2. Flow field measurement of the VIF

Chap 3. Detection of nanoparticles using the VIF-induced aggregation

Chap 4. 3D numerical simulation of flow field

Chap 5. Detection of extracellular vesicles

Chap 6. Conclusion

4. 論文の独自性や成果

従来のイムノアフィニティ法では、抗体等の担体と標的分子・粒子の混合・吸着 (流体操作) と標的分子の検出は、別々に分離されている。そのため、それぞれに異なる原理や測定機器を用いる必要があった。流体操作の部分にマイクロ流体チップを用いることで小型化す

る研究はほかにもなされていたが、測定の部分は高感度な蛍光顕微鏡や電気化学測定装置等にたよる必要があった。本研究は、免疫凝集法を採用し、それをマイクロチップ化することで、マイクロチップと振動源、および低倍率の明視野顕微鏡観察のみで高感度な標的 NP 検出を実現したところに実用的な価値がある。検出器としての性能評価だけでなく、流れ場の計測や数値計算による詳細な粒子凝集のメカニズムの解明も行っており、音響流れの分野における学術的な貢献度も高い。

5. 論文の課題

本研究では、上記のようにシンプルなシステム構成で標的 NP の高感度検出を実現した一方、実際には振動誘起に比較的大きなピエゾ駆動ステージを、観察に研究室レベルの顕微鏡を用いている。実用化に際しては、これらの要素を小型化する必要がある。最終章において、振動には小型の偏心モーターを、観察には簡易拡大レンズを取り付けたスマートフォンを用いることなどが想定されているが、実際にそのようなシステム構築につながることを望ましい。

6. 論文の評価

本論文は、疾病診断や環境モニタリングで必要とされている生体由来ナノ粒子検出法に新しいレパートリーを加えるもので、当該分野における学術的貢献度はきわめて高く、本論文が博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、2023年12月22日に、論文内容とそれに関連した事項についての諮問を行った結果、合格と認定した。